

© Е. А. Аксенова, Т. Н. Покладок,
Д. В. Бойко, Н. Г. Даниленко

ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси»

ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ РИСКА НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЙ, В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

✿ **Определены популяционные частоты генотипов и аллелей +49A/G гена цитотоксического антигена Т-лимфоцитов 4 (CTLA4); –1858C/T гена тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (PTPN22) и –23HphIA/T гена инсулина (INS) у этнических белорусов шести этногеографических регионов. Частота гомозиготных носителей аллелей риска составила: +49G гена CTLA4 — 17,3 %; –23HphIA гена инсулина — 50,7 % и –1858T гена PTPN22 — 4,1 %. Гомозиготный генотип риска по всем трем локусам выявлен у 5 человек из 662 обследованных, гомозиготная комбинация протективных аллелей обнаружена у 21 человека. Показана однородность распределения аллелей и генотипов исследованных локусов по территории Беларуси.**

✿ **Ключевые слова:** CTLA4; PTPN22; ген инсулина; аутоиммунные заболевания; популяционные частоты у белорусов.

Аутоиммунные заболевания — группа тяжелых заболеваний, при которых организм перестает распознавать собственные ткани и запускает процесс их деструкции. Нарушение механизма регулирования иммунной системы организма зависит, прежде всего, от особенностей строения и функционирования генетического аппарата, гормонального статуса, возраста, однако инициирует процесс тот или иной внешний фактор: патоген, режим питания, поллютанты окружающей среды (воды и воздуха), стрессы и др. (Primmel et al., 2004; Whitacre, 2001; Knip, 2005; Beland, 2009). В последнее время частота аутоиммунных заболеваний в разных странах мира значительно возросла, что связано, прежде всего, с триггерными эффектами патогенных вирусов, особенностями современного питания и активным внедрением фармакологических препаратов в повседневную жизнь (Gale et al., 2005; Albert, 1999; Maya, 2008).

Аутореактивные В и Т лимфоциты в незначительном количестве обычно содержатся в пуле иммунных клеток, в здоровом организме синтезируется также некоторое количество аутоантител (Smith, Germolec, 1999). Однако при определенных условиях это равновесие ломается, и развивается аутоиммунная агрессия против того или иного органа. Так, при болезни Грейвса обнаруживаются аутоантитела к рецептору тиреотропина, что приводит к гиперактивности щитовидной железы; при аутоиммунном гипотиреозе происходит разрушение Т-клетками тиреоцитов в щитовидной железе; диабет 1 типа возникает при аутоиммунном разрушении β-клеток Т-лимфоцитами (Ueda et al., 2003).

Формирование принципиально новой отрасли — молекулярной медицины — затронуло непосредственно и широкий круг аутоиммунных патологий — активно исследуются генетические механизмы контроля этих процессов. Аллели риска различных генов являются также предметом предиктивной медицины (Баранов и др., 2003; Meyer, Gut, 2002; Miyake et al., 2009). К настоящему времени обнаружено более 40 генов, которые обеспечивают наследственную предрасположенность к аутоиммунным патологиям, однако реализация этой предрасположенности осуществляется только при эпистатическом взаимодействии аллелей риска. Клинически разные заболевания могут возникнуть на фоне сходного генотипа риска по ряду плейотропных генов (Vyse, Todd, 1996; Forebosco et al., 2009). Кроме того, для разных этносов генотипы риска могут различаться (Marron et al., 1997; Sahin et al., 2009; Lee et al., 2009).

К наиболее значимым полиморфным локусам в связи с риском развития аутоиммунных патологий относятся гены главного комплекса гистосовместимости HLA. Помимо этого, исследуются так называемые не HLA локусы (non-HLA loci), к которым относятся однонуклеотидная замена (SNP) +49A/G в 1 экзоне гена кодирующего цитотоксический антиген (рецептор) Т-лимфоцитов 4 (CTLA4) (rs121775) и миссенс-полиморфизм 1858C/T в гене тирозиновой фосфатазы лимфоцитов (PTPN22) (rs247660).

В ряде исследований доказана взаимосвязь вышеперечисленных генотипов с развитием таких заболеваний как псориаз, аутоиммунные тиреоидиты (болезнь Грейвса, болезнь Хашимото), диабет 1 типа, рассеянный склероз, ревматоидный артрит (Forebosco et al., 2009).

Внимание исследователей к роли продуктов генов CTLA4 и PTPN22 не случайно. В процессе созревания Т-лимфоцитов в тимусе происходит селек-

Поступила в редакцию 18.12.2009
Принята к публикации 05.02.2010

тивное отсеивание аутореактивных клеток и их программируемая гибель (апоптоз). Важную роль в этом процессе играет цитотоксический рецептор Т-лимфоцитов (*CTLA4*), задачей которого является селекция и апоптоз Т-клеток с высокой аутореактивностью (обладающих повышенным сродством к собственным HLA рецепторам) (Kristiansen et al., 2000).

Ген *CTLA4* располагается на 2-й хромосоме в локусе 2q33 между двумя генами активаторами Т-лимфоцитов: геном рецептора-активатора (CD28) и геном индуцируемого костимулятора (ICOS) (Coyle et al., 2000; Kim, Polychronakos, 2005). Изоформа рецептора (full-length isoform — flCTLA4), который синтезируется в активированных Т-лимфоцитах, закодирована в 4 экзонах: лидерный белок кодируется экзоном 1, связывающий лиганды домен — экзоном 2, трансмембранная область — экзоном 3 и цитоплазматический домен — экзоном 4 (Ueda et al., 2003). Всего известно более 30 точечных однонуклеотидных замен (SNP) в различных районах *CTLA4* гена [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&go=Go&locusId=1493]. Одним из привлекающих внимание исследователей является однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении +49 экзона 1 (+49 A/G) (rs121775). Транзиция аденина на гуанин приводит к аминокислотной замене треонина на аланин в 17 кодоне лидерного пептида. Это вызывает снижение функциональной активности белка *CTLA4* (Kouki et al., 2000).

Ген *PTPN22* находится на первой хромосоме 1p13, кодирует белок Lyp — тирозиновую фосфатазу лимфоцитов, взаимодействующую с сигнальной молекулой цитоплазматической c-Src тирозинкиназы (Csk). Точечная однонуклеотидная замена цитозина на тимин в позиции 1858 (rs2476601) этого гена приводит к замене аргинина на триптофан (R620W) в SH3-связывающем сайте белка (одном из четырех). Аллель риска аутоиммунных заболеваний *1858T PTPN22* является так называемой мутацией увеличения функции. У людей, несущих аллель риска *1858T* гена *PTPN22*, обнаружено повышение каталитической активности Lyp и увеличение отрицательной регуляции активации Т-лимфоцитов (Vang et al., 2005).

Одним из наиболее распространенных в мире аутоиммунных заболеваний является диабет 1 типа (Т1Д). Помимо двух вышеописанных аллельных полиморфизма, в генотип-ассоциированных исследованиях диабета 1 типа рассматривается SNP (rs689) — *23HphIA/T* в интроне 1 гена инсулина (*INS*). Ген *INS* находится между генами тирозингидроксилазы (TH) и инсулиноподобного фактора роста II (IGF2). Заболевание развивается при аутоиммунной деструкции бета-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Аутоантигеном бета-клеток выступает инсулин. При эффективной экспрессии гена инсулина в тимусе нарабатывается толерантность (снижение аутореактивности) Т-клеток к инсулину. Большинство исследователей — *23HphIA/T* полиморфизм

используется в первую очередь в качестве удобного маркера для генотипирования полиморфного tandemного (минисателлитного) повтора в промоторной области гена инсулина (*INS VNTR*) (Stene et al., 2006; Sejkova et al., 2008; Benedek et al., 2009). Минисателлитная последовательность *VNTR* (variation in the number of tandem repeats) в 5'- фланкирующей области инсулинового гена обнаружена Беллом с коллегами (Bell et al., 1981). В зависимости от числа повторов *INS VNTR* аллели подразделяются на 3 класса: наиболее короткая последовательность (26–63 повтора) относится к классу I, а наиболее длинная (141–209 повторов) — к классу III. Промежуточный по длине класс II редко встречается у европейцев. Наиболее короткий аллельный вариант данной последовательности I класса связывают с предрасположенностью к ИЗСД 1 (Kennedy et al., 1995). Аллель *A* в сайте узнавания эндонуклеазой *HphI* 3'-последовательности интрона 1 гена инсулина коррелирует с I классом *VNTR*, а *T* аллель — с протективным классом III (Day et al., 2006).

По данным Минздрава Беларуси общая заболеваемость болезнями крови, кроветворных органов и отдельными нарушениями, вовлекающими иммунный механизм, в 2008 году составила 560,1 на 100 000 населения (Здравоохранение в Республике Беларусь. Официальный статистический сборник за 2008 г.). Около 0,15% населения Беларуси болеют аутоиммунным инсулинзависимым диабетом 1 типа, около 1% — ревматоидным артритом.

Задачей нашего исследования было определить популяционные частоты генотипов по трем полиморфным локусам генов цитотоксического антигена Т-лимфоцитов 4 *CTLA4* (+49A/G); тирозиновой фосфатазы лимфоцитов *PTPN22* (1858C/T) и инсулина *INS* — *23HphIA/T* у этнических белорусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения проекта использовался ДНК-банк популяций этнических белорусов, проживающих в различных регионах Беларуси, собранный сотрудниками лаборатории (Кушнеревич Е. И., Сивицкой Л. Н., Даниленко Н. Г. и Давыденко О. Г.) в 2004–2006 гг.

Генотипирование по генам *CTLA4*, *PTPN22* и *INS* выполнялось методом ПЦР-ПДРФ анализа. Полимеразная цепная реакция проводилась с набором праймеров к соответствующим районам генома (табл. 1) на амплификаторах MJ Mini (Bio-Rad) или MyCycler (Bio-Rad). Реакционная смесь объемом 10–15 мкл содержала: ПЦР-буфер с 60 mM трис-HCl pH 8,5; 25 mM KCl; 0,1% Тритон X-100 («ДИАЛАТ ЛТД» ЗАО, г. Москва); по 0,25 mM каждого из dNTP; 1,5–2,5 mM MgCl₂; 4 pmol прямого и обратного праймеров, 1 U Taq ДНК-полимеразы («ДИАЛАТ ЛТД» ЗАО, г. Москва), 1 мкл ДНК. Условия проведения амплификации: начальная денатурация при 94°C — 4 мин; затем 35 циклов по сле-

Таблица 1

Праймеры к соответствующим районам генома, использованные в анализе

Локус	Последовательность праймеров	Источник	Tm, °C	Размер фрагмента
CTLA4+49A/G	F 5'-AAGGCTCAGCTGAACCTGGT-3' R 5'-CTGCTGAAACAAA TGAAACCC-3'	(Lee et al., 2002)	57	152 п. о.
PTPN22-1858 C/T	F 5'-GATAATGTTGCTTCAACGGAATTT-3' R 5'-CCATCCCACACTTTATTTATACT-3'	(Dieudé et al. 2005)	57	252 п. о.
-23HphIA/T INS	F 5'-AGCAGGTCTGTTCCAAGG-3' R 5'-CTTGGGTGTG TAGAAGAAGC-3'	(Mitchell et al., 2004)	60	360 п. о.

Таблица 2

Размеры фрагментов для ПЦР-ПДРФ анализа полиморфных локусов генов *CTLA4*, *PTPN22* и *INS*

Алель	Размеры фрагментов	Фермент
CTLA4 +49A CTLA4 +49G	130 п. о. и 22 п. о. 152 п. о.	<i>BstEII</i>
PTPN22 1858 C PTPN22 1858 T	217 и 35 п. о., 252 п. о.	<i>RsaI</i>
-23HphI A INS -23HphI T INS	129 п. о., 40 п. о., 191 п. о. 129 п. о. и 231 п. о.	<i>HphI</i>

Таблица 3

Частоты генотипов +49 A/G гена *CTLA4* в выборках белорусов из разных регионов

Регион	G/G (%)	п	A/G (%)	п	A/A (%)	п
Центральный	19,4	24	60,5	75	20,2	25
Восток (Поднепровье)	12,4	16	60,5	78	27,1	35
Восточное Полесье	19,5	25	42,2	54	38,3	49
Западное Полесье	13,5	21	55,8	87	30,8	48
Запад (Понеманье)	23,0	23	45,0	45	32,0	32
Север(Подвинье)	18,5	24	53,8	70	27,7	36
Всего	17,4	133	53,3	409	29,3	225

дующей программе: денатурация 40 сек при 94°C; отжиг 40 сек (см. таблицу 1), элонгация 40 сек при 72°C и финальная элонгация при 72°C — 4 мин.

Продукты амплификации подвергались эндонуклеазной обработке ферментами фирмы Fermentas UAB (Литва), представленными в таблице 2. Продукты ПЦР-ПДРФ анализа генов *INS*, *CTLA4* и *PTPN22* анализировали после электрофоретического разделения в 6% неденатурирующем полиакриламидном геле, окрашенном раствором бромистого этидия в УФ-свете на трансиллюминаторе ЕСХ-15М (Vilber Lourmat).

Сравнение эмпирических распределений частот проводилась с использованием программы АВ-Stat по методу Хи-квадрат без поправки на непрерывность Иейтса по следующей формуле (Рокицкий, 1964):

$$\chi^2 = \frac{1}{n_1 n_2} \sum \frac{(f_1 n_2 - f_2 n_1)^2}{f_1 + f_2},$$

где f_1 и f_2 — частоты, а n_1 и n_2 — численность выборок. Этногеографические карты строили при помощи программы Surfer 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частоты генотипов +49A/G *CTLA4* в популяциях белорусов

Для 767 человек из 6 этногеографических регионов страны установлены генотипы по +49 A/G аллелям гена *CTLA4* (rs121775) (табл. 3). Генотип риска GG обнаружен у 17,4% изученных белорусов и 53,3% являются гетерозиготами. Самая высокая частота — 23%, обнаружена у жителей западного региона, распределение частот генотипов в котором достоверно отличается от популяции восточного региона Беларуси ($\chi^2 = 6,68$ при $P < 0,05$). Также частоты выборки юго-восточного региона (восточного Полесья) достоверно отличаются от показателей центрального ($\chi^2 = 11,16$ при $P < 0,01$) и восточного (Поднепровья)

Таблица 4

Частоты генотипов –1858С/Т гена *PTPN22* в выборках белорусов из разных регионов

Регион	С/С (%)	п	С/Т (%)	п	Т/Т (%)	п
Центральный	73,6	92	24,0	30	2,4	3
Восток (Поднепровье)	69,4	75	25,9	28	4,6	5
Восточное Полесье	63,5	80	32,5	41	4,0	5
Западное Полесье	72,9	113	20,6	32	6,5	10
Запад (Понеманье)	76,8	73	21,1	20	2,1	2
Север(Подвинье)	64,1	84	32,1	42	3,8	5
Всего	69,8	517	26,1	193	4,1	30

Таблица 5

Частоты генотипов –23HphIА/Т гена инсулина у белорусов из разных регионов

Регион	А/А (%)	п	Т/А (%)	п	Т/Т (%)	п
Центральный	47,6	59	41,1	51	11,3	14
Восток (Поднепровье)	59,2	45	28,9	22	11,8	9
Восточное Полесье	52,0	66	38,6	49	9,4	12
Западное Полесье	46,1	71	40,9	63	13,0	20
Запад (Понеманье)	44,6	33	47,3	35	8,1	6
Север (Подвинье)	56,4	75	33,8	45	9,8	13
Всего	50,7	349	38,5	265	10,8	74

регионов ($\chi^2 = 8,67$ при $P < 0,05$). Самая высокая частота гетерозиготных носителей (60,5 %) выявлена в выборках белорусов центрального и восточного регионов, тогда как в восточном Полесье зафиксировано больше всего носителей гомозиготных генотипов (38,3 %) по протективному аллелю +49А.

Диапазон частот аллеля риска +49G по регионам Беларуси составляет 40,6–49,6 % (рис. 1, 2А). Достоверно по этим показателям центральный регион отличается от южных регионов: восточного Полесья ($\chi^2 = 4,1$ при $P < 0,05$) и западного Полесья ($\chi^2 = 3,8$ при $P < 0,05$).

Частоты генотипов 1858С/Т *PTPN22* в популяциях белорусов

Для 740 человек установлены генотипы по –1858 С/Т гена *PTPN22* (rs247660) (табл. 4). Гомозиготный генотип риска обнаружен у 4,1 % исследованной выборки, протективный генотип — у 69,8 %. Достоверных отличий между регионами по частоте генотипов +1858 С/Т гена *PTPN22* обнаружено не было, за исключением северного региона (Подвинье), который достоверно отличался по исследуемому показателю от западного (Понеманье) ($\chi^2 = 4,2$ при $P < 0,05$). Больше всего носителей генотипа риска ТТ гена *PTPN22* обнаружено среди коренных жителей западного Полесья (6,5 %).

Различия по частотам аллелей гена *PTPN22* (рис. 1) были достоверны при сравнении выборок восточного Полесья и западного региона ($\chi^2 = 4,45$ при $P < 0,05$), а также северного региона (Подвинья) с западным ($\chi^2 = 4,1$ при

$P < 0,05$). Самая низкая частота аллеля риска +1858Т гена *PTPN22* выявлена в выборке западного региона (Понеманье) по сравнению со всеми остальными проанализированными регионами (рисунки 1, 2Б).

Частоты генотипов –23HphIА/Т *INS* в популяциях белорусов

Более половины исследованной популяции белорусов являются гомозиготными носителями аллелей риска по инсулиновому гену, и только 10,8 % несут протективные аллели –23HphIТ в гомозиготном состоянии (табл. 5). Не отличаются между собой данные по частотам генотипов и аллелей –23HphIА/Т гена инсулина (rs689) в шести регионах Беларуси (всего прогенотипировано 688 человек).

Протективный аллель –23HphIТ чаще встречается в выборке центрального, западного (Понеманье) и юго-западного (западное Полесье) регионов, и реже всего на востоке и севере Беларуси (рис. 1, 2В), но во всех случаях этот показатель незначительно отличался от среднего значения 30,0% для всей выборки.

Комбинации генотипов риска по исследованным генам предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям

Наибольшая частота аллелей риска для коренных жителей Беларуси наблюдается по инсулиновому гену — 70 %, наименьшая (17,1 %) — для гена *PTPN22* (рис. 1).

Было проведено сопоставление частот встречаемости комбинаций генотипов по трем полиморфным локусам: +49А/Г *CTLA4* (rs121775); 1858С/Т *PTPN22*

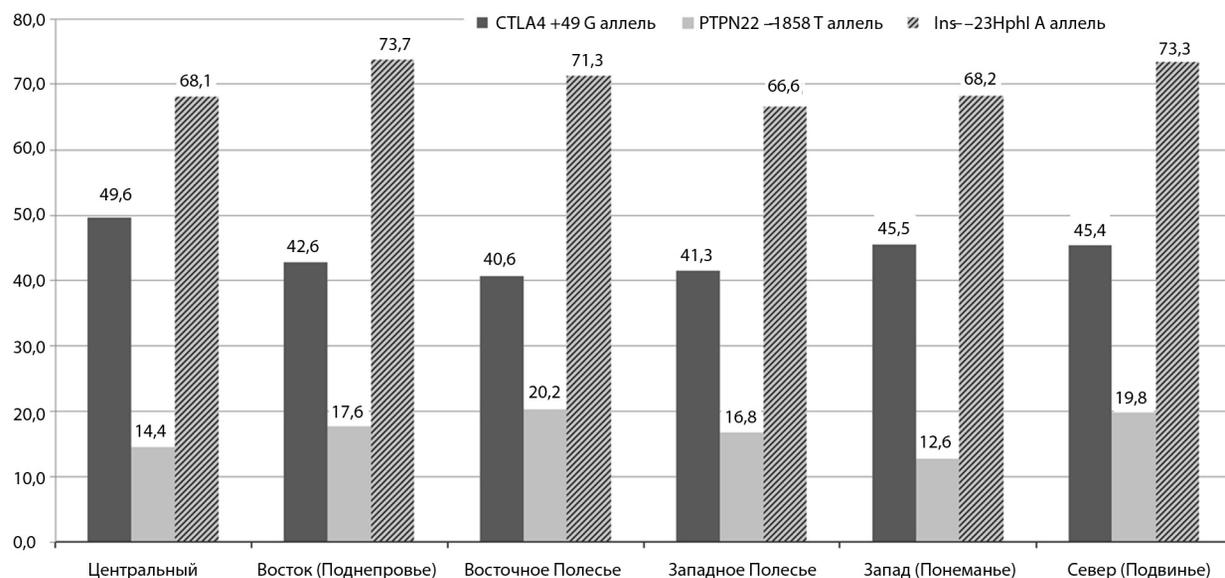


Рис. 1. Частоты аллелей риска по трем полиморфным локусам

(rs247660) и $-23HphIA/T$ *INS* (rs689) у 662 человек из шести этногеографических регионов Беларуси, результаты представлены на рисунке 3. Частотные данные по комбинациям генотипов между регионами достоверно не различались. Гомозиготный генотип риска $GG_{CTLA4}-TT_{PTPN22}-AA_{INS}$ по всем трем локусам обнаружен у 5 человек (0,8%). В выборках центрального, восточного и западного регионов людей с таким генотипом вообще не выявлено. Среди изученных белорусов 21 человек (3,2%) имели протективный генотип $AA_{CTLA4}-CC_{PTPN22}-TT_{INS}$, причем самый высокий процент таких людей в западном Полесье (6%). Самый часто встречающийся генотип: $AG_{CTLA4}-CC_{PTPN22}-AA_{INS}$ имели 18,1% проанализированных людей. Ни у одного человека из изученной выборки не найдено комбинаций генотипов $AG_{CTLA4}-TT_{PTPN22}-TT_{INS}$ и $AA_{CTLA4}-TT_{PTPN22}-TT_{INS}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований выборок этнических белорусов, проживающих в основных этногеографических регионах страны, установлено, что по гену *CTLA4* преобладает гетерозиготное носительство аллеля риска +49G — 53,3%; половина людей (50,7%) имеют генотип риска $-23HphI$ AA по гену инсулина и 69,8% являются обладателями протективного гомозиготного генотипа -1858 CC по гену *PTPN22*. Всего гомозиготный генотип риска по всем трем локусам +49A/G *CTLA4*; 1858C/T *PTPN22* и $-23HphIA/T$ *INS* ($GG_{CTLA4}-TT_{PTPN22}-AA_{INS}$) имеют 0,8%, а генотип, сочетающий протективные гомозиготные аллели по трем генам ($AA_{CTLA4}-CC_{PTPN22}-TT_{INS}$), обнаружен у 3,2% белорусов.

Полученные нами частоты аллелей и генотипов +49A/G *CTLA4*; 1858C/T *PTPN22* и $-23HphIA/T$ *INS* в основном согласуются с данными, опубликованными для других европейских популяций и представителей европеоидной расы других стран. Гетерозиготное носительство аллеля риска +49G *CTLA4* у здоровых жителей Москвы и Московской области колеблется в диапазоне 50–51% (Андреевский и др., 2002; Абрамов и др., 2007). В выборке здоровых жителей Германии 45% обладали +49AG *CTLA4* генотипом, среди жителей Канады выявлено 48% носителей гетерозиготного генотипа (Donner et al., 1997). Частота аллеля риска +49G *CTLA4* у 43,4% жителей Польши (Krokowski et al., 1998) близка к полученному нами показателю — 44,0%.

У 17,1% исследованных белорусов генотипирован 1858T аллель риска гена *PTPN22*. Частота 1858T аллеля в контроле у испанской популяции ниже — она составляет 6,7% (Santiago et al., 2007). В исследованной популяции здоровых жителей Германии данный показатель составил 10% (Pierer et al., 2006).

Согласно исследованиям С. Guja с соавторами, в румынской популяции частота встречаемости аллеля риска $-23HphIA$ гена инсулина составляет 78,3% (было изучено 219 семей) (Guja et al., 2004). Аналогичные результаты были получены для чешской популяции — частота встречаемости аллеля $-23HphIA$ составляет 75,8% (Sejkova et al., 2008). В Великобритании частота аллеля риска $-23HphIA$ контрольной выборки из 837 людей составила 71,1% (Tait et al., 2004). Это практически полностью совпадает с нашими данными — 70,0% изученных белорусов несут $-23HphIA$ аллель.

Очевидно, что быть носителем генотипа риска и заболеть — не одно и то же. Однако прогнозная оценка вероятности развития аутоиммунного заболевания у но-

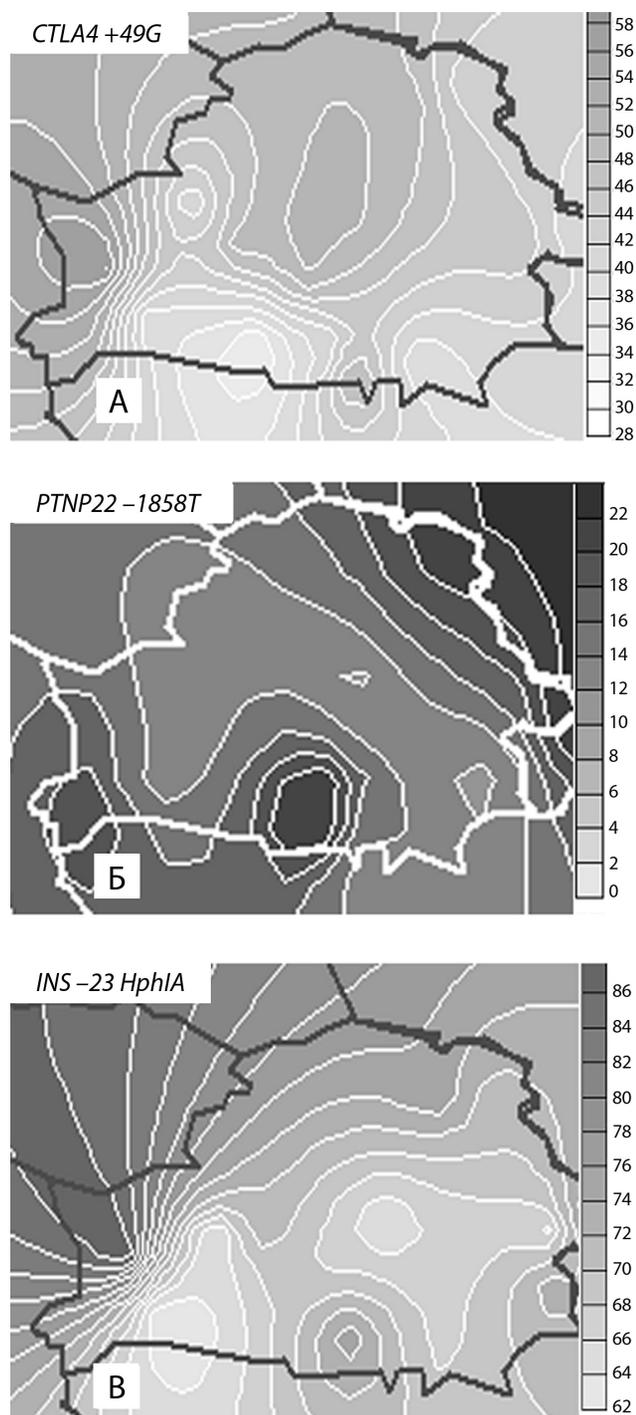


Рис. 2. Карты распределения частот аллелей риска у белорусов из 18 мест сбора шести этногеографических регионов: (А) +49G аллеля гена *CTLA4*; (Б) –1858Т аллеля гена *PTPN22*; (В) –23HphIA аллеля гена инсулина

сителей аллелей риска выше, чем у обладателей протективного генотипа. При изучении полиморфизма –23HphI (А/Т) *INS* гена у жителей США показано, что генотип

АА в группе больных диабетом встречается в 1,5–2 раза чаще по сравнению со здоровыми людьми ($P < 0,05$) (Krechler et al., 2009). Уровень аутоантител к инсулину у людей с ТТ генотипом *INS* –23HphI в три раза ниже, чем у имеющих АА генотип (Butty et al., 2008). Изучение 88 семей (448 пациентов), страдающих аутоиммунным полигландулярным синдромом 3 типа — мультиплексным (сочетанным) по Д1Т и АЗЦЖ заболеванием — выявило наличие у них генотипов риска по всем трем генам *CTLA4*, *INS* и *PTPN22* (Villano et al., 2009). В иранской популяции частота аллеля +49G *CTLA4* гена была достоверно выше у больных диабетом 1 типа, чем в контрольной выборке (45 % и 33,4 % соответственно, $p = 0,00269$) (Mojtahedi et al., 2005). У больных диабетом 1 типа с устойчивой выработкой антител к инсулину отмечается более высокая частота 1858Т аллеля риска гена *PTPN22* (Steck et al., 2009). В хорватской популяции определена достоверно более высокая частота 1858Т аллеля гена *PTPN22* у больных диабетом 1 типа, чем у здоровых людей ($p < 0,0001$) (Korolija et al., 2009). *PTPN22* 1858Т аллель также чаще, чем в популяции жителей Финляндии, встречался у финских детей с диабетом 1 типа, у которых прием коровьего молока в раннем младенчестве (до 6 месяцев) спровоцировал развитие аутоиммунного процесса (Lempainen et al., 2009).

Ревматоидный артрит, поражающий от 0,5 до 1 % населения чаще развивается у носителей 1858Т аллеля *PTPN22* гена (Farago et al., 2008; Forebosco et al., 2009). У больных ревматоидным артритом немецкой популяции частота 1858Т аллеля *PTPN22* гена оказалась вдвое выше — 21,3 %, чем у здоровых контролей — 10 % (Pieger et al., 2006). Заметим, однако, что в ряде исследований связь +49G *CTLA4* аллеля и ревматоидного артрита не подтверждается. Так, ассоциация ревматоидного артрита (РА) с полиморфизмом в 1-м экзоне *CTLA4* не была обнаружена после того, как из обследованной выборки были исключены пациенты с аутоиммунным заболеванием щитовидной железы (Vaidya et al., 2002).

Подобно генетике других мультифакториальных заболеваний, существуют этнические особенности зависимости генотипа и риска развития аутоиммунных заболеваний. Не обнаружено связи между частотой аллелей 1858С/Т *PTPN22* гена и риском развития ревматоидного артрита в популяциях Туниса и Турции (Chabchoub et al., 2009; Sahin et al., 2009). Не является *PTPN22* геном риска ревматоидного артрита у корейцев и японцев (Lee et al., 2009; Kochi et al., 2009).

Полученные нами результаты дополняют данные по популяционным частотам аллелей генов, участвующих в регуляции иммунного гомеостаза организма у европейцев. Показана однородность распределения аллелей и генотипов исследованных локусов по территории Беларуси. Вместе с тем, установленные у белорусов популяционные частоты трех важнейших связанных с аутоиммунными заболеваниями генов «non-HLA об-

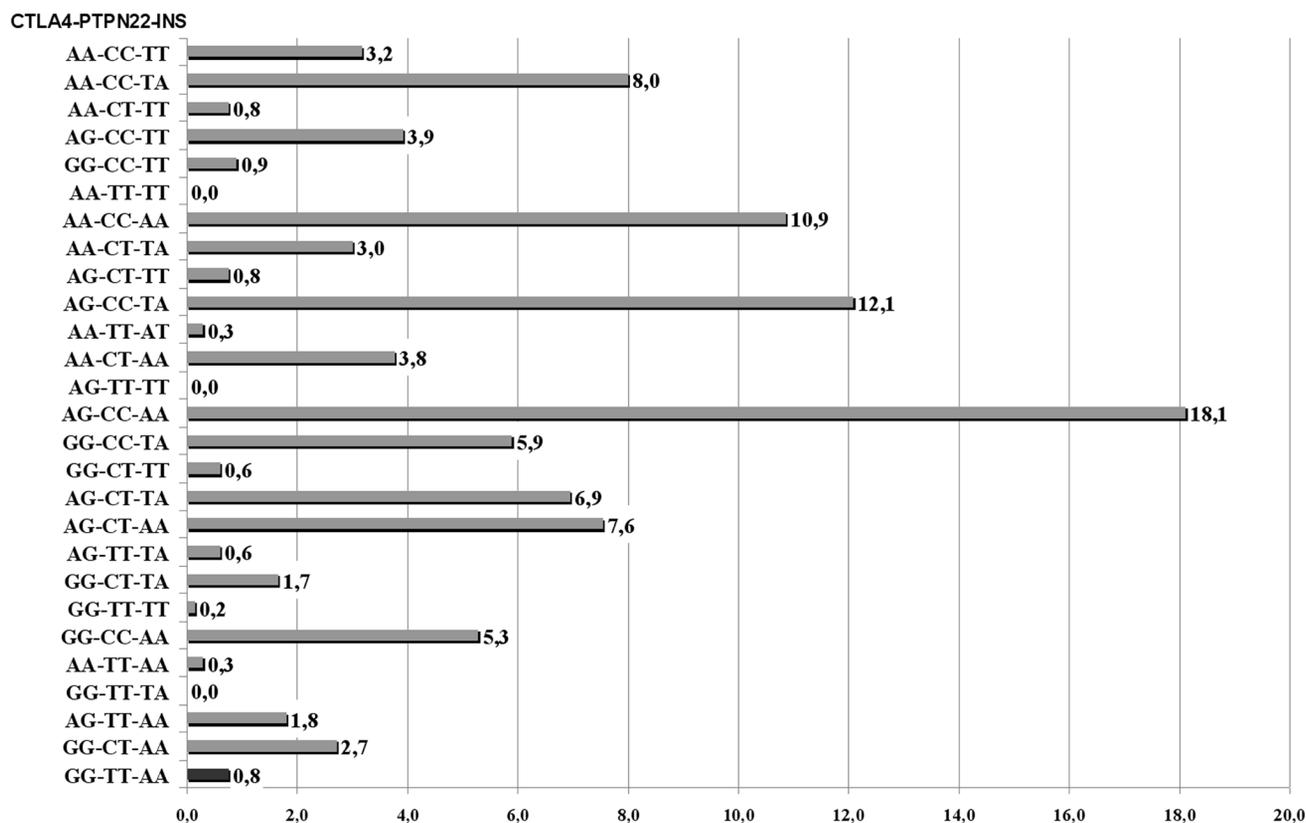


Рис. 3. Частоты (в %) комбинаций генотипов по изученным локусам (+49A/G *CTLA4* (rs121775); 1858C/T *PTPN22* (rs247660) и -23HphI A/T *INS* (rs689)) у белорусов
Черным выделен генотип риска ($GG_{CTLA4} - TT_{PTPN22} - AA_{INS}$)

ласти» являются базовыми показателями для сравнительной оценки и определения генотипов риска у пациентов с Т1Д, аутоиммунным тиреоидитом, ревматоидным артритом и другими аутоиммунными патологиями в Беларуси.

Исследования проводились при финансовой поддержке ГПОФИ «Биоинженерия и биобезопасность» задание 38.

Литература

1. Абрамов Д. Д., Дедов И. И., Трофимов Д. Ю. и др., 2007. Полиморфизм гена *CTLA4* (49A/G) в русской популяции у больных сахарным диабетом 1 типа и здоровых доноров // Сахарный диабет. Т. 3. С. 2–3.
2. Андреевский Т. В., Судомоина М. А., Гусев Е. И. и др., 2002. Полиморфизм A/G в положении +49 первого экзона гена *CTLA4* при рассеянном склерозе у русских // Молекулярная биология. Т. 36. С. 643–648.
3. Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э., 2003. Научные основы предиктивной медицины // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Альфа-Виста. С. 3–19.
4. Здравоохранение в Республике Беларусь. Официальный статистический сборник за 2008 г. 2009. Минск. ГУ РНМБ. С. 148.
5. Рокицкий П. Ф., 1964. Биологическая статистика Минск: Высшая школа. С. 273
6. Albert L. J., Inman R. D., 1999. Molecular mimicry and autoimmunity // N. Engl. J. Med. Vol. 341. P. 2068–2074.
7. Beland K., Lapierre P., Alvarez F., 2009. Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis // World J. Gastroenterol. Vol. 15. P. 1025–1034.
8. Bell G. I., Karam J. H., Rutter W. J., 1981. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 78. P. 5759–5763.
9. Benedek G., Brautbar C., Vardi P. et al., 2009. Effect of polymorphism in insulin locus and *HLA* on type 1 diabetes in four ethnic groups in Israel // Tissue Antigens. Vol. 73. P. 33–38.
10. Butty V., Campbell C., Mathis D. et al., 2008. Susceptibility Loci on Progression From Pre-Diabetes to Diabetes in At-Risk Individuals of the Diabetes Prevention Trial—Type 1 (DPT-1) // Diabetes. Vol. 57. P. 2348–2359.

- 11 *Cejkova P., Novota P., Cerna M. et al.*, 2008. HLA DRB1, DQB1 and insulin promoter VNTR polymorphisms: interactions and the association with adult-onset diabetes mellitus in Czech patients // *Int J Immunogenet.* Vol. 35. P.133–140.
- 12 *Chabchoub G., Teixeira E.P., Maalej A. et al.*, 2009. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase 22 gene in autoimmune thyroid diseases and rheumatoid arthritis in the Tunisian population // *Ann Hum Biol.* Vol. 36. P.342–349.
- 13 *Coyle A. J., Lehar S., Lloyd C. et al.*, 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses // *Immunity.* Vol. 13. P.95–105.
- 14 *Day I. N. M., Rodriguez S., Královičová J.*, 2006. Questioning *INS* VNTR role in obesity and diabetes: subclasses tag IGF2-INS-TH haplotypes; and –23HphI as a STEP (splicing and translational efficiency polymorphism) // *Physiol. Genomics* Vol. 28. P.113.
- 15 *Dieudé P., Garnier S., Michou L. et al.*, 2005. Rheumatoid arthritis seropositive for the rheumatoid factor is linked to the protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22-620W allele // *Arthritis Research & Therapy.* Vol. 7. P. R1200–R1207 (DOI 10.1186/ar1812).
- 16 *Donner H., Rau H., Walfish P. G. et al.*, 1997. *CTLA4* alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus // *J Clin Endocrinol Metab.* Vol. 82. P. 143–146.
- 17 *Farago B., Talian G. C., Komlosi K. et al.*, 2008. Protein tyrosine phosphatase gene *C1858T* allele confers risk for rheumatoid arthritis in Hungarian subjects // *Rheumatol Int.* Vol. 29. P.793–796.
- 18 *Forebosco P., Bouzigon E., Ng M. Y. et al.*, 2009. Meta-analysis of genome-wide linkage studies across autoimmune diseases // *European Journal of Human Genetics.* Vol. 17. P.236–243.
- 19 *Gale E. A.*, 2002. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century // *Diabetes* Vol. 51. P.3353–3361.
- 20 *Guja C, Guja L, Nutland S. et al.*, 2004. Strong association of insulin gene *INS*-VNTR polymorphisms with type 1 diabetes in the Romanian population // *Rom. J. Intern Med.* Vol. 42. P.313–323.
- 21 *Kennedy G. C., German M. S., Rutter W. J.*, 1995. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus *IDDM2* regulates insulin transcription // *Nat. Genet.* Vol. 9. P.293–298.
- 22 *Kim M. S., Polychronakos C.*, 2005. Immunogenetics of type 1 diabetes // *Horm. Res.* — Vol. 64. P. 180–188.
- 23 *Knip M., Veijola R., Virtanen S. M. et al.*, 2005. Environmental Triggers and Determinants of Type 1 Diabetes // *Diabetes.* Vol. 54. SP.2. P. S125–S136.
- 24 *Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K.*, 2009. Genetics of rheumatoid arthritis: Underlying evidence of ethnic differences // *J. Autoimmun.* Vol. 32. P. 158–162.
- 25 *Korolija M., Renar I.P., Hadžija M. et al.*, 2009. Association of *PTPN22* C1858T and *CTLA4* A49G polymorphisms with type 1 diabetes in Croats // *Diabetes Res Clin Pract.* Oct 6. [Epub ahead of print].
- 26 *Kouki T., Sawai Y., Gardine C. A. et al.*, 2000. *CTLA4* gene polymorphism at position 49 of exon 1 reduces the inhibitory function of *CTLA4* and contributes to the pathogenesis of Graves' disease // *J Immunol.* Vol. 165. P.6606–6611.
- 27 *Krechler T., Jachymova M., Pavlikova M. et al.*, 2009. Polymorphism –23HphI in the promoter of insulin gene and pancreatic cancer: A pilot study // *Neoplasma.* Vol. 56. P.26–32.
- 28 *Kristiansen O. P., Larsenand Z. M., Pociot F.*, 2000. *CTLA4* in autoimmune diseases — a general susceptibility gene to autoimmunity? // *Genes and Immunity.* Vol. 1. P. 170–184.
- 29 *Krokowski M., Bodalski J., Bratek A. et al.*, 1998. *CTLA4* gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland // *Diabetes Metab.* Vol. 24. P.241–243.
- 30 *Lee H. S., Korman B. D., Le J. M. et al.*, 2009. Genetic risk factors for rheumatoid arthritis differ in Caucasian and Korean populations // *Arthritis Rheum.* Vol. 60. P.364–371.
- 31 *Lee S. Y., Lee Y. H., Shin C. et al.*, 2002. Association of asthma severity and bronchial hyperresponsiveness with a polymorphism in the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene // *Chest.* Vol. 122. P. 171–176.
- 32 *Lempainen J., Vaaralac O., Mäkelä M., et al.* 2009. Interplay between *PTPN22* C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes // *Journal of Autoimmunity.* Vol. 33. P. 155–164.
- 33 *Marron M. P., Raffel L. J., Garchon H.-J. et al.*, 1997. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with *CTLA4* polymorphisms in multiple ethnic groups // *Human Molecular Genetics.* Vol. 6. P. 1275–1282.
- 34 *Maya R., Gershwin M. E., Shoenfeld Y.*, 2008. Hepatitis B Virus (HBV) and Autoimmune Disease // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* Vol. 34. P.85–102.
- 35 *Meyer U. A., Gut J.*, 2002. Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity // *Toxicology.* Vol. 181–182. P.463–466.
- 36 *Mitchell S. M. S., Hattersley A. T., Knight B. et al.*, 2004. Lack of support for a role of the insulin gene variable number of tandem repeats minisatellite (*INS*-VNTR) locus in fetal growth or type 2 diabetes-related intermediate traits in United Kingdom populations // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 89. P.310–317.
- 37 *Miyake K., Yang W., Hara K. et al.*, 2009. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association // *J. Hum. Genet.* Vol. 54. P.236–241.
- 38 *Mojtahedi Z, Omrani G. R., Doroudchi M., Ghaderi A.*, 2005. *CTLA4* +49 A/G polymorphism is associated with

- predisposition to type 1 diabetes in Iranians // *Diabetes Res. Clin. Pract.* Vol. 68. P. 111–116.
- 39 *Pierer M., Kaltenhäuser S., Arnold S., et al.*, 2006. Association of *PTPN22* 1858 single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients // *Arthritis Research & Therapy* 8:R75 (doi:10.1186/ar1945) online: <http://arthritis-research.com/content/8/3/R75> (дата обращения: 25.08.2009).
- 40 *Prummel M. F., Strieder T., Wiersinga W. M.*, 2004. The environment and autoimmune thyroid diseases // *Eur. J. Endocrinol.* Vol. 150. P. 605–618.
- 41 *Sahin N., Gunduz F., Inanc N. et al.*, 2009. No association of *PTPN22* gene polymorphism with rheumatoid arthritis in Turkey // *Rheumatol Int. Apr.* 9. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00296-009-0919-2.
- 42 *Santiago J. L., Martínez A., de la Calle H. et al.*, 2007. Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the *PTPN22* C1858T polymorphism in the Spanish population // *BMC Med Genet.* 8:54 <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/8/54> (дата обращения: 25.08.2009).
- 43 *Smith D. A., Germolec D. R.*, 1999. Introduction to immunology and autoimmunity // *Environ Health Perspect.* Vol. 107. P. 661–665.
- 44 *Steck A. K., Zhang W., Bugawan T. L. et al.*, 2009. Do non-HLA Genes Influence Development of Persistent Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes in Children with High-Risk *HLA-DR, DQ* Genotypes? // *Diabetes.* Vol. 58. P. 1028–1033.
- 45 *Stene L. C., Thorsby P. M., Berg J. P. et al.*, 2006. The relation between size at birth and risk of type 1 diabetes is not influenced by adjustment for the insulin gene (–23HphI) polymorphism or *HLA-DQ* genotype // *Diabetologia.* Vol. 49. P. 2068–2073.
- 46 *Tait K. F., Collins J. E., Heward J. M. et al.*, 2004. Evidence for a Type 1 diabetes-specific mechanism for the insulin gene-associated *IDDM2* locus rather than a general influence on autoimmunity // *Diabet Med.* Vol. 21. P. 267–270.
- 47 *Ueda H., Howson J. M., Esposito L. et al.*, 2003. Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease // *Nature.* Vol. 423. P. 506–511.
- 48 *Vaidya B., Pearce S. H. S., Charlton S. et al.*, 2002. An association between the *CTLA4* exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies // *Rheumatology.* Vol. 41. P. 180–183.
- 49 *Vang T., Congia M., Macis M. D. et al.*, 2005. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant // *Nat Genet.* Vol. 37. P. 1317–1319.
- 50 *Villano M. J., Huber A. K., Greenberg D. A. et al.*, 2009. Autoimmune thyroiditis and diabetes: dissecting the joint genetic susceptibility in a large cohort of multiplex families // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol. 94. P. 1458–1466.
- 51 *Vyse T. J., Todd J. A.*, 1996. Genetic analysis of autoimmune disease // *Cell.* Vol. 85. P. 311–318.
- 52 *Whitacre C. C.*, 2001. Sex differences in autoimmune disease // *Nat. Immunol.* Vol. 2. P. 777–780.

The frequencies of autoimmunity risk alleles of some genes in Belarus population

E. A. Aksyonova, T. N. Pokladok, D. V. Boiko, N. G. Danilenko

✿ **SUMMARY:** The population genotype and allele frequencies of +49A/G cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (*CTLA4*); C1858T protein tyrosine phosphatase gene (*PTPN22*); –23HphI/T insulin gene (*INS*) loci in native Belarusians from 6 ethnogeographic regions were estimated. The frequencies of risk allele homozygotes were: +49G *CTLA4* — 17,3%; –23HphI *INS* 50,7% — 1858T *PTPN22* — 4,1%. 5 individuals out of 662 investigated were risk homozygotes for all three genes, 21 were homozygotes with protective allele combination. The uniformity of genotypes and alleles distribution of investigated locuses across Belarus regions was demonstrated.

✿ **KEY WORDS:** *CTLA4*; *PTPN22*; insulin gene; autoimmune diseases; populations frequencies in Belarusians.

✿ Информация об авторах

Аксенова Елена Анатольевна — с. н. с., к. б. н.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Покладок Татьяна Николаевна — магистрант.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Бойко Дина Викторовна — аспирант.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Даниленко Нина Генусовна — в. н. с., к. б. н.
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Aksyonova Elena A. — senior research scientist, PhD.
Institute of Genetics and Cytology Belarus NAS.
Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Pokladok Tatiana N. — MS.
Institute of Genetics and Cytology Belarus NAS.
Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Boiko Dina V. — PhD student.
Institute of Genetics and Cytology Belarus NAS.
Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.

Danilenko Nina G. — leader research scientist, PhD.
Institute of Genetics and Cytology Belarus NAS.
Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Belarus.
E-mail: cytoplasmic@mail.ru.